

活性窒素種が誘起する生体内酸化およびニトロ化分子の検出に関する研究

著者	石井 雄二
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	星薬科大学
学位授与年度	2006年度
学位授与番号	32676甲第112号
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000348/

氏 名 (本 籍)	石 井 雄 二	(東 京 都)
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)	
学 位 記 番 号	甲 第 112 号	
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 15 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者	
学位論文の題名	活性窒素種が誘起する生体内酸化およびニトロ化分子の検出に関する研究	
論 文 審 査 委 員	主 査	教 授 中 澤 裕 之
	副 査	教 授 瀬 山 義 幸
	副 査	教 授 鈴 木 勉

論文内容の要旨

生体内における活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) の生成は様々な疾病を引き起こすことが知られている。ROS にはスーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2^-$)、過酸化水素、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) や一重項酸素などが存在する。一方、RNS には一酸化窒素 (NO)、ペルオキシナイトライト (ONOO^\cdot) や二酸化窒素ラジカル ($\cdot\text{NO}_2$) などがある。これらの物質は極めて反応性が高いことから、生体内において複雑な反応を引き起こし、最終的にデオキシリボ核酸 (DNA)、タンパク質および脂質といった生体高分子を酸化およびニトロ化することが知られている。RNS によって修飾される代表的な生体分子として、タンパク質ではチロシン (Tyr) やトリプトファンがニトロ化されて 3-ニトロチロシン (NO_2Tyr) やニトロトリプトファンを生成し、他方、DNA ではデオキシグアノシン (dG) が酸化およびニトロ化されて 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) や 8-ニトログアニン (NO_2Gua) を生成する。とりわけ、RNS によって DNA 中に生成される NO_2Gua は脱塩基領域を形成し、8-OHdG はそれ自身が変異原性を有することから、これらのニトロ化および酸化物質は生体内における RNS 生成のバイオーカーとしてだけでなく、発がんをはじめとする種々の疾病の機序解明において極めて重要な手がかりとなる。

本研究では、NO が引き起こすフェノール性化合物の酸化反応に着目し、電子スピン共鳴法 (ESR) 等を用い、カテコールと NO の反応により生成される RNS を始めとするラジカル種を検出した。また、*in vivo* において RNS により修飾された生体分子の検出を行うことで、これらの反応が亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) とカテコール併用投与によるラット前胃発がん促進機構に関与することを証明した。更に、精度の高

い生体内 RNS 生成と RNS による DNA 損傷の評価法の確立を目的として、タンパク質中 NO_2Tyr と DNA 中 NO_2Gua の分析法を構築した。

1-1. カテコールと NO のラジカル反応機構の解明

NO は種々のフェノール性化合物と反応し、それらを一電子酸化する。カテコールと NO を反応させ、吸光光度スペクトルの変化を観察した結果、カテコールの極大吸収の減少とともに、キノンの生成が確認された。また、本反応系で生成するラジカル種の検出を行った結果、カテコールと NO の反応によりセミキノンラジカル、 $\cdot\text{OH}$ および ONOO^- の生成が確認された。これらの結果から、NO によるカテコールの一電子酸化で生成したセミキノンラジカルが、キノンへと酸化される際に酸素から $\cdot\text{O}_2^-$ が生成し、過剰な NO が $\cdot\text{O}_2^-$ と反応し、 ONOO^- を経て $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{NO}_2$ が生成するという反応機構を提唱した。

1-2. カテコール、 NaNO_2 併用投与によるラット前胃発がん促進機構の解明

NaNO_2 は酸性条件下において多量の NO を産生することから、カテコールとの併用投与によりラット胃内においてカテコールと NO のラジカル反応が生じると考えられる。カテコールと NO のラジカル反応では ONOO^- を経て最終的に $\cdot\text{NO}_2$ と $\cdot\text{OH}$ を生成することから、病理組織学的検索と共に、DNA 中 8-OHdG の測定と、タンパク質中 NO_2Tyr の検出を行った。

6 週令の雄 F344 ラットを対照群、0.2% NaNO_2 飲水投与群、0.8% カテコール混餌投与群および 0.2% NaNO_2 、0.8% カテコール併用投与群の計 4 群に配し、投与開始 12 時間、24 時間、1 週および 2 週間後に屠殺した。病理組織学的検索の結果、併用投与群では投与後 24 時間から粘膜下組織における細胞浸潤がみられ、2 週目では過形成と、細胞浸潤を伴う潰瘍性病変が観察された。一方、対照群および NaNO_2 、カテコールの単独投与群においては全ての時間において変化は見られなかった。免疫化学染色法による NO_2Tyr の検出では、併用投与群で種々の病変に先立って投与後 12 時間から粘膜上皮細胞で陽性細胞が観察され、2 週目では粘膜上皮における過形成部位でその存在が認められた。さらに、前胃粘膜上皮 DNA の 8-OHdG 生成量は NO_2Tyr と同様、併用投与群において投与後 12 時間から対照群に比べ優位な上昇がみられ、2 週目では対照群に比べ約 8 倍の上昇が認められた。一方、免疫化学染色法による iNOS の検出では、併用投与群の 2 週目においてのみわずかに観察された程度であった。すなわち、8-OHdG や NO_2Tyr の生成は、炎症細胞が産生する ROS や iNOS が産生する RNS ではなく、外因性の RNS に起因することを示している。これらの結果から、 NaNO_2 とカテコール併用投与によるラット前胃発がん促進機構として、胃内で生じる NO とカテコールの

ラジカル反応により生成する ONOO⁻が起因することを証明した。

2-1. タンパク質中 NO₂Tyr 測定法の構築

生体内における RNS 生成の評価法として、免疫化学染色法による NO₂Tyr の検出法は、簡便かつその生成部位を特定できることから極めて有用な手段である。しかしながら、その定量性は低く、わずかな生成量の変化を検出することは極めて困難であることから、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) によるタンパク質中 NO₂Tyr 測定法の構築を検討した。

NO₂Tyr と Tyr を測定対象物質とし、その定量値から NO₂Tyr/Tyr 値を算出した。質量分析法において精度良く測定するには、それぞれの測定対象物質の安定同位体をサロゲート物質として用いるのが極めて有効であることから、¹³C でラベル化された Tyr から [¹³C₉]-NO₂Tyr を合成した。LC-MS/MS による Tyr および NO₂Tyr の測定感度は検出限界が 30 および 0.1 nM、定量限界は 100 および 0.5 nM と、NO₂Tyr については高感度な測定法を構築した。タンパク質の消化にはプロテアーゼによる酵素処理法を採用し、サロゲート物質を同時に添加することで、前処理操作から測定に至る過程でのバラツキを補正した。B6C3F1 マウスから採取した肝組織での添加回収試験の結果、回収率は 92~99% の範囲と良好な結果が得られた。

2-2. NO₂Tyr 測定法の組織試料への適用

タンパク質前処理法と LC-MS/MS による測定法の有用性を確認するため、本法と免疫化学染色法を、RNS 生成が知られる毒性量 (300 mg/kg) のアセトアミノフェン (APAP) を投与した 6 週令の雄 B6C3F1 マウスの肝組織へ適用した。LC-MS/MS による測定結果では、NO₂Tyr は全ての群から検出され、対照群の NO₂Tyr/Tyr 値は $33.9 \pm 2.9 \mu\text{mol/mol}$ であった。また APAP 投与後 2、4 および 8 時間群では全て対照群より有意な上昇が見られ、その値は 4 時間が最大であった ($46.8 \pm 3.4 \mu\text{mol/mol}$)。一方、免疫化学染色法による検出では、前述の測定結果と同様、対照群においてもわずかに NO₂Tyr 陽性細胞が観察され、投与群においては小葉中心に NO₂Tyr 陽性細胞の増加が認められた。また、その強度は投与後 4 時間で最大となり、8 時間では過度の空胞変性と細胞の壊死が認められたことから、本法による測定結果は、これらの病変を反映していることが確認され、わずかな NO₂Tyr 生成量の変化も正確に捉えることが可能な極めて優れた分析法であることを確認した。

3. DNA 中 NO₂Gua の分析法と RNS による DNA 損傷評価法の構築

NO₂Gua の分析には極性の低下を目的に 2-メトキシグリオキサールによる誘導体化を採用し、カラムスイッチング (CS) システムを備えた液体クロマトグラフィー-質

量分析法 (LC-MS) による測定法を構築した。CS の採用はオンラインでの試料の精製と濃縮を可能にし、サロゲート物質として [^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]- NO_2Gua を用いることで、前処理操作から測定に至るまでのバラツキを補正した。本法における NO_2Gua の測定感度は検出限界が 1.0 nM、定量限界が 3.0 nM と良好な感度を得られた。DNA の前処理にはヌクレアーゼ P1 とアルカリフォスファターゼによる酵素処理法を採用し、本法と従来から用いられている液体クロマトグラフィー-紫外可視吸光度検出-電機化学検出器 (LC-UV-ECD) による 8-OHdG 分析法を併用することで、1 つの DNA 試料から NO_2Gua 、8-OHdG そして dG を測定することを可能にし、得られた定量値から $\text{NO}_2\text{Gua}/10^5\text{dG}$ 値および $8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$ 値を算出した。LC-MS による NO_2Gua の測定法の DNA 試料中での添加回収率は、99% と極めて良好な回収率を得られた。本評価法を RNS の一つである ONOO^- を反応させた仔牛胸腺 DNA へ適用した結果、高濃度の ONOO^- では NO_2Gua と 8-OHdG が同程度で生成することを明らかにした。このことから、多量の RNS 生成が知られる炎症性疾患等における DNA 損傷を評価するには、酸化とニトロ化の二つの修飾塩基を評価する必要性を明らかにし、本法はそれらを一つの DNA 試料から測定することが可能な優れた評価法であることを確認した。

このように、RNS により修飾された生体分子の検出は、生体内において極めて不安定な RNS の生成量を間接的に評価することが可能であり、生体内での反応機構や種々の疾病への関与の解明に有用である。更に近年、それら修飾物質自体の変異原性を始めとする種々の生理機能も明らかになってきていることから、これらの優れた分析法の開発は RNS による新たな傷害や発がん機構の解明において極めて重要な手段となる。

論文審査の結果の要旨

生体内における活性酸素種や活性窒素種によって、様々な疾病が引き起こされる。中でも活性酸素種によるDNAの酸化は点突然変異を引き起こし、多くの発がん機構に関与している。一方、活性窒素種についても、肝炎のような炎症性疾患で生成することが知られており、炎症から発がんへの移行過程において直接関与することが疑われている。そこで生体内における活性窒素種の生成について、その評価方法の構築や生体影響とその作用機序を解明することが要求されている。

活性窒素種は極めて反応性が高く、活性酸素種と共存した場合、極めて複雑な反応を引き起こし、より活性の高い分子種を生成する。そのため、生体内で生成した活性窒素種は複雑な反応を介して、DNA、タンパク質および脂質といった様々な生体高分子をニトロ化もしくは酸化する。これらニトロ化物質または酸化物質はその構造変化によって様々な障害の要因になると考えられる。

活性窒素種と様々な疾病との関連性や作用機序を解明するには、その生成量を明らかにすることが重要であり、信頼性の高い活性窒素種の分析法の構築が必要である。しかし、生体内で生成する活性窒素種は極微量かつ極めて不安定であることから直接検出することは困難である。本研究では、生体内で生成されたニトロ化物質および酸化物質を検出することで、活性窒素種と発がんの関連性を明らかにするとともに、活性窒素種によって生成されるタンパク質およびDNA中のニトロ化物質の分析法を確立した。

*in vitro*では電子スピン共鳴法を用いて、一酸化窒素とカテコールの反応過程で生成される活性酸素種や活性窒素種を検出し、その反応機構を考察した。*in vivo*では食品添加物として使用される亜硝酸ナトリウム及びカテコールの併用投与によりラット前胃のDNAおよびタンパク質中に生成する酸化およびニトロ化物質を検出し、生体内における活性窒素種の存在を明らかにし、*in vitro*で考察した一酸化窒素とカテコールの応機構によって生成する活性窒素種が、亜硝酸ナトリウム及びカテコール併用投与によるラット前胃発がん促進機構に関与することを明らかにした。

更に、生体内における活性窒素種生成の評価法の確立として、高速液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析法によるタンパク質中ニトロチロシンの高感度かつ高精度な分析法を確立した。組織試料を測定対象とするため、試料からのタンパク質の抽出および酵素処理による消化方法を構築し、可能な限り煩雑な前処理操作を排除することで汎用性の高い分析法を構築した。更に、本法を用いて肝炎を誘発させたマウス肝組織中ニトロチロシンを測定することで、本法の有用性を確認した。

DNAの酸化によって生成される8-ヒドロキシデオキシグアノシンは既に点突然変異を引き起こし、多くの発がん機構に関与することが明らかとなっている。一方、ニトロ化によって生成される8-ニトログアニンについては発がんとの直接的な関係は未だ明らかとなっていない。その理由として優れた分析法が未だに構築されていないことが挙げられる。そこで活性窒素種と発がんとの関連性を明らかにする手段として、高速液体クロマトグラフィー - 質量分析法によるDNA中8-ニトログアニンの分析法を構築した。更にDNAの酸化によって生成する修飾塩基である8-ヒドロキシデオキシグアノシンの測定法と併用することで、DNA中に生成する酸化修飾塩基およびニトロ化修飾塩基の評価法を確立した。また、本評価法を用いて、*in vitro*におけるDNAと活性窒素種の反応によりこれら2種類の修飾塩基が生成されることを実証した。

本研究で構築された分析法および知見は、生体内での活性窒素種の存在や反応機構の解明に貢献し、様々な疾病や新たな発がん機構を解明する上で大きく寄与するものと期待される。

従って、本論文は博士（薬学）を授与するに十分値するものと判定した。